Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 14, No. 5, Dec- Jan 2019, p. 685-698

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد 14، شماره 5، آذر- دی 1397، ص. 698-685

مقایسه تنوع میکروبی دوغ گوسفندی عشایر ناحیه سومار به کمک روش‌های نسل جدید توالی‌یابی و مولکولی وابسته به کشت

نفیسه دعوتی[1]*- شهره حسامی[2]

تاریخ دریافت: 1396/09/20
تاریخ پذیرش: 1397/01/20

چکیده

برخی مردم نگران مصرف مواد غذایی ارگانیکی هستند که احتمالا توسط ریزسازواره‌های بیماری‌زا آلوده شده‌اند، زیرا برخی از این مواد غذایی تحت شرایط بهداشتی ضعیف تولید می‌شوند. هدف از این مطالعه ارزیابی کیفیت بهداشتی دوغ گوسفندی از عشایر سومار و شناسایی کل جامعه میکروبی آن به‌خصوص باکتری‌های اسید لاکتیک می‌باشد. مجموع 40 باکتری اسید لاکتیک از 3 نمونه دوغ گوسفندی جدا گردید. این جدایه‌ها براساس روش مولکولی وابسته به کشت، توسط تکثیر ژن 16S rRNA با پرایمرهای یونیورسال 27F و 1492R و توالی‌یابی، به‌صورت *Lactobacillus apis* %20، *Lactobacillus ultunensi*, %10*Pediococcus argentinicus*, %10 و *Lactobacillus delbrueckii* %40 شناسایی گردیدند. این شناسایی توسط روش مولکولی مستقل از کشت براساس نسل جدید توالی یابی آمپلیکون‌های ژن 16S ribosomal RNA کامل شد. نواحی V3 و V4 از ژن 16S rRNA تکثیر شد و توسط پلتفرم Illumina MiSeq توالی‌یابی گردید. این داده‌ها با نرم‌افزار BaseSpace و بانک اطلاعاتی greengenes آنالیز گردید. جامعه میکروبی دوغ گوسفندی برپایه نسل جدید توالی‌یابی در سطح جنس به‌صورت %94/08 Lactobacillus، %1/07 Pediococcus، %0/33 Streptococcus، %0/20 Enterococcus، %0/11 Candidatus Blochmannia، %0/11 Alkalibacillus، %0/06 Cohnella و %3/02 باکتری غیرقابل طبقه‌بندی شناسایی شدند. در سطح گونه به‌صورت %24/82 *Lactobacillus equicursoris*، %51/81 *Lactobacillus delbrueckii*، %3/61 *Lactobacillus apis*، %2/79 *Lactobacillus ultunensis*، %0/86 *Lactobacillus taiwanensis*، %0/85 *Lactobacillus gigeriorum*، %0/42 *Pediococcus argentinicus* و %13/64 باکتری غیرقابل طبقه‌بندی شناسایی شدند. روش نسل جدید توالی‌یابی در شناسایی تنوع میکروبی دوغ صحیح‌تر و بهتر شناخته شد. نتایج نشان داد دوغ گوسفندی عشایر سومار از کیفیت ضعیف بهداشتی برخوردار است اما هیچ باکتری بیماری‌زایی در این محصول شناسایی نگردید.

واژه‌های کلیدی: نسل جدید توالی‌یابی، دوغ، گوسفند، عشایر

مقدمه

باتوجه به افزایش بیماری‌های ناشی از مصرف محصولات غذایی صنعتی به دلیل استفاده بی رویه و نامناسب از رنگهای خوراکی، اسانس‌های شیمیایی، نگهدارنده‌ها و سایر افزودنی‌های شیمیایی، مردم تمایل زیادی به مصرف محصولات ارگانیک پیدا کرده‌اند. اغلب این محصولات را می‌توان از مردم مناطق روستایی و عشایر ساکن در دل طبیعت به‌دست آورد. عشایر به دلیل اصرار در حفظ شیوه زندگی بمانند گذشتگان خود، اجازه به ورود تکنولوژی صنعتی در زندگی خود نداده و سنت‌های قدیمی به‌خصوص آداب غذایی خود را حفظ کرده‌اند و به ندرت می‌توان ردپایی از غذاهای صنعتی در زندگی آن‌ها یافت. یکی از محصولات غذایی اصلی آن‌ها محصولات لبنی نظیر پنیر، ماست، کره، دوغ، کشک و غیره می‌باشد. عشایر بسیاری از تولیدات دامی و لبنی خود را برای فروش به شهر می‌برند و مردم ساکن در شهر و همچنین بسیاری مسافران بازدیدکننده از مناطق عشایری از طرفداران این محصولات ارگانیک محسوب می‌شوند. اما در کنار غنی بودن فراورده‌های لبنی عشایری از سویه‌های بومی کشور و عدم استفاده از کشت‌های آغازگر وارداتی، نگرانی اصلی مردم از کیفیت پایین بهداشتی این محصولات می‌باشد. زیرا عشایر بدون استفاده از ابزار و تکنولوژی صنعتی و بدون رعایت استانداردهای بهداشتی،

1- استادیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده صنایع غذایی بهار، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران.
2- استادیار، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران.
(*- نویسنده مسئول: Email: n.davati@basu.ac.ir)
DOI: 10.22067/ifstrj.v14i5.69335

محصولات لبنی خود را به‌صورت سنتی تولید می‌کنند.

باکتری‌های اسیدلاکتیک اهمیت زیادی در فراورده‌های تخمیری دارند و فعالیت‌های متابولیکی آن‌ها منجر به تولید مواد فرّار موثر در توسعه طعم، آروما و بافت شده و همچنین باعث افزایش زمان ماندگاری فراورده‌های لبنی می‌شوند (Khedid *et al*., 2009). برخی از باکتری‌های اسیدلاکتیک پروبیوتیک بوده و می‌توانند به دلیل فعالیت‌های ضدتوموری، کاهش کلسترول سرم، درمان نقص عدم تحمل لاکتوز، تحریک سیستم ایمنی و تثبیت فلور میکروبی دستگاه گوارش اثرات مفید بر سلامت انسان داشته باشند (Ashmaig *et al*., 2009). اکثر فراورده‌های لبنی تخمیری بومی هر منطقه دارای فلور میکروبی ویژه منحصر به خود می‌باشند و همین تفاوت‌ها باعث ایجاد تنوع در رایحه و طعم آن‌ها شده است. برای حفظ خواص ارگانولپتیکی محصولات لبنی تخمیری هر منطقه باید باکتری‌های اسید لاکتیک ذاتی محصولات بومی آن شناسایی شوند. از این‌رو با توجه به اهمیت فلور میکروبی هر محصول تخمیری در ایجاد خواص حسی (طعم، عطر و بافت)، ضدباکتریایی، درمانی، پروبیوتیکی و همچنین شناسایی ذخایر ژنتیکی با ارزش کشور بهتر است مطالعات مربوطه در مناطق بکر، نظیر عشایر که حاوی جوامع کاملا سنتی می‌باشند، متمرکز شود. روش‌های شناسایی سویه‌های میکروبی شامل روش‌های فنوتیپی (بر اساس خصوصیات فیزیولوژی، مورفولوژی و تست‌های بیوشیمیایی) و مولکولی (براساس نواحی ژنتیکی عمدتا ژن ناحیه 16S rRNA) می‌باشد. امروزه می‌توان از مطالعات متاژنومیکس بر پایه تکنیک‌های نسل جدید توالی‌یابی[1] به‌عنوان جدیدترین روش‌های شناسایی مولکولی به‌منظور بررسی بهتر فیلوژنتیکی و تنوع متابولیکی ریزسازواره‌ها بهره برد. در گذشته درک صحیح از تنوع میکروبی نمونه‌های مورد مطالعه براساس تکنیک‌های وابسته به کشت بسیار مشکل و طاقت فرسا بود. اغلب این تکنیک‌ها براساس کلونینگ و توالی‌یابی ژن 16S ribosomal RNA (rDNA) توسط طیف وسیعی از پرایمرهای PCR انجام می‌گیرد (Nossa *et al*., 2010). با پیشرفت‌های اخیر در توالی‌یابی موازی به‌صورت گسترده، محققین قادر شدند تا به‌طور مستقیم آمپلیکون‌های PCR خود را توالی‌یابی کنند (Mardis, 2008; Armougom and Raoult, 2009).

با استفاده از تکنیک نسل جدید توالی‌یابی جهت آنالیز جوامع میکروبی می‌توان مطالعه دقیق‌تر و کامل‌تری از دینامیک میکروبی محصولات تخمیری به‌دست آورد (Bokulich and Mills, 2012).

هدف از این مطالعه ارزیابی کیفیت بهداشتی دوغ تولیدی از شیر گوسفندی عشایر سومار واقع در منطقه قصر شیرین، پیگیری احتمال وجود باکتری‌های بیماری‌زا، شناسایی سویه‌های بومی منطقه سومار و بررسی وجود باکتری‌های پروبیوتیک در آن با استفاده از تکنیک متاژنومیکس بر پایه نسل جدید توالی‌یابی جهت شناسایی دقیق و کامل جامعه میکروبی آن می‌باشد. زیرا این روش اطلاعات کاملی از کل جامعه میکروبی، میزان غالب بودن هر یک از جنس‌ها و گونه‌های موجود را ارائه می‌دهد. انتظار می‌رود در این مطالعه توسط تکنیک NGS بتوان درک بهتر و کاملتری از جامعه میکروبی دوغ عشایر سومار ایران به‌عنوان یک محصول کاملا ارگانیک پیدا کرد.

مواد و روش‌ها

سه نمونه دوغ گوسفندی از عشایر منطقه سومار تحت شرایط استریل جمع‌آوری و در دمای 4 درجه سانتی‌گراد به آزمایشگاه انتقال داده شد. هرنمونه در آب پپتونه تا رقت 10^{-7} رقیق‌سازی گردید و سپس جهت شناسایی فلور لاکتیکی نمونه تا سطح جنس از رقت‌های مختلف در محیطهای MRS آگار، M17 آگار و KAA آگار کشت گردیدند و توسط گازپک نوع A در جار بی‌هوازی در دمای 37 درجه سانتی‌گراد به مدت 48 ساعت گرمخانه‌گذاری شدند. سپس هر کلنی متفاوت از لحاظ رنگ، اندازه، تحدب، تقعر و شکل، توسط کشت خطی تا 3 مرحله خالص‌سازی گردیدند. پس از انجام تست کاتالاز و رنگ‌آمیزی گرم برای هر کلنی، جدایه‌های گرم مثبت و کاتالاز منفی به‌عنوان جدایه مشکوک به باکتری اسید لاکتیک در نظر گرفته شدند (Harrigan Harold, 1998; Benson, 1967).

شناسایی فنوتیپی جدایه‌ها در سطح جنس

آزمایش‌های بیوشیمیایی جهت تشخیص تا سطح جنس برای کلیه جدایه‌ها به‌صورت زیر صورت گرفت: بررسی رشد در دو دمای 10°C و45°C، در دو غلظت 6/5% و 18% کلرور سدیم، در pH=9/6 و pH=4/4، بررسی تولید گاز دی‌اکسید کربن از قند گلوکز در محیط براث MRS اصلاح شده حاوی لوله دورهام جهت تشخیص هومو و هتروفرمنتاتیو بودن (Salminen & Von Wright, 2004). به‌منظور بررسی هیدرولیز آرژنین توسط جدایه‌ها، از محیط ردی براث استفاده شد (Cardinal *et al*., 1997).

شناسایی مولکولی وابسته به کشت جامعه میکروبی نمونه دوغ گوسفندی

استخراج DNA

جهت استخراج DNA، کلنی خالص از هر جدایه در 100 µl آب استریل تعلیق‌سازی شد و سپس 100 µl از الکل ایزوآمیل/کلروفرم (24/1) اضافه گردید و بعد از مخلوط کردن به مدت 5 ثانیه، در 16000 g به مدت 5 دقیقه سانتریفوژ شد. سپس از فاز آبی بالا به‌عنوان منبع DNA و الگو برای واکنش PCR استفاده گردید (Ruiz-Barba *et al*., 2005).

---
1 Next Generation Sequencing

انجام عملیات PCR جهت تکثیر ناحیه ژن 16S rRNA و ژل الکتروفورز

پرایمرهای Universal جهت تکثیر ژن 16S rRNA شامل B27F و U1492R (Bioneer، کره) به‌صورت زیر بودند:

Forward:
B27F (5′-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3′)
Reverse:
U1492R (5′-ACGTGGTTTGAAGAGATTTTCG-3′)

واکنش PCR به‌وسیله مخلوط کردن 2 µl از DNA هر جدایه، 16 µl آب استریل فاقد آنزیم DNAse (سیناکلون، ایران)، 1 µl از هریک از پرایمرهای B27F و U1492R (غلظت 10 picomole/µl) با کیت خشک 2X PCR Master (Intron، کره) به‌وسیله دستگاه ترموسایکلر با پروفایل برنامه دمایی زیر انجام گردید.

فعال‌سازی[1] در 95°C به مدت 5 دقیقه، 35 سیکل مراحل واسرشته‌سازی[2] در 94°C به مدت 30 ثانیه، اتصال[3] در 50°C به مدت 45 ثانیه و توسعه[4] در 72°C به مدت 2 دقیقه. در نهایت توسعه نهایی[5] در 72°C به مدت 10 دقیقه انجام گردید. الکتروفورز به مدت 30 دقیقه با ولتاژ 95 ولت انجام شد. سپس ژل در دستگاه ژل داک[6] قرار داده شد و تشکیل باند 1500 bp بررسی شد (Alegría *et al*., 2009).

عملیات توالی‌یابی توسط شرکت ماکروژن کره انجام شد. توالی خوانش شده با توالی‌های موجود در بانک اطلاعاتی ژن[7] با کمک برنامه بلاست[8] در سایت http://www.NCBI.nlm.nih.gov مقایسه گردید. جدایه‌هایی با 98% مشابهت یا بیش از آن در توالی به‌عنوان همانگونه شناسایی شدند.

شناسایی مولکولی مستقل از کشت جامعه میکروبی نمونه دوغ گوسفندی

استخراج DNA کل از نمونه دوغ گوسفندی

استخراج DNA از نمونه توسط کیت DNeasy ®Blood & Tissue Kit شرکت QIAGEN انجام گردید.

شناسایی مولکولی به روش Next generation sequencing

DNA از نمونه دوغ گوسفندی جهت توالی‌یابی به روش (NGS) Next generation sequencing به مرکز آنالیز ژنومیکس پیشرفته

1 Activation
2 Denaturation
3 Annealing
4 Extension
5 Final extension
6 Gel doc
7 Gen Bank
8 Blast

دانشگاه گولف کانادا[9] ارسال گردید و کلیه مراحل توالی‌یابی NGS براساس پرتوکل Illumina sequencing و با انجام دو PCR مطابق مراحل زیر انجام گردید:

الف) تهیه 16S DNA Library

تهیه 16S DNA Library از نمونه DNA دوغ گوسفندی بر اساس پرتوکل 16S metagenomic sequencing library protocol (Illumina) انجام گردید. PCR اول با پرایمرهای نشان داده در زیر جهت تکثیر نواحی V3 و V4 از ژن 16S rRNA برای آمپلیکون به اندازه 460 bp در 3 تکرار انجام شد.

Forward Primer:
TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACA
GCCTACGGGNGGCWGCAG
Reverse Primer:
GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACA
GGACTACHVGGGTATCTAATCC

آداپتور Overhang به توالی‌های جفت پرایمر جهت سازگاری با Illumina index الحاق گردید. توالی‌های آداپتور Illumina overhang به شرح زیر می‌باشد.

Forward overhang:
5’TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGAC
AG-[locus-specific sequence]
Reverse overhang:
5’GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGA
CAG-[locus-specific sequence].

ب) انجام Amplicon PCR

واکنش PCR به‌وسیله مخلوط کردن 2/5 µl (5 ng/µl) از DNA مخلوط میکروبی، 5 µl از هریک از پرایمرهای اشاره شده در بالا (با غلظت 1 µM) و 12/5 µl از 2x KAPA HiFi hotstart readymix به‌وسیله دستگاه ترموسایکلر با برنامه دمایی شامل مرحله فعال‌سازی در دمای 95°C به مدت 3 دقیقه، 25 سیکل مراحل واسرشته‌سازی در 95°C به مدت 30 ثانیه، اتصال در 55°C به مدت 30 ثانیه، توسعه در 72°C به مدت 30 ثانیه، و در نهایت مرحله توسعه نهایی در 72°C به مدت 5 دقیقه برای هر نمونه در 3 تکرار به همراه نمونه کنترل انجام گردید.

ج) انجام Index PCR

بعد از تمیزسازی محصول PCR، شاخص‌های دوگانه[10] و آداپتورهای توالی‌یابی Illumina توسط کیت Nextera XT Index به آن الحاق گردید. لیستی از توالی شاخص‌های مورد استفاده در جدول 1 نشان داده شده است. واکنش PCR به حجم 50µL حاوی

9 Genomics Facility , Advanced Analysis Centre, University of Guelph
10 dual indices

25µl از 2x KAPA HiFi hotstart readymix و 5 µl از DNA، 5µl از هریک از پرایمرهای Nextera XT index 1 و Nextera XT index 2 و 10µl آب با درجه PCR به‌وسیله دستگاه ترموسایکلر با برنامه دمایی شامل مرحله فعال‌سازی در دمای 95°C به مدت 3 دقیقه، 8 سیکل مراحل واسرشته‌سازی در 95°C به مدت 30 ثانیه، اتصال در 55°C به مدت 30 ثانیه، توسعه در 72°C به مدت 30 ثانیه، و در نهایت مرحله توسعه نهایی در 72°C به مدت 5 دقیقه انجام گردید.

جدول 1- لیست توالی‌های index مورد استفاده در نسل جدید توالی‌یابی

Index 1 (i7) Sequence	Index 2 (i5) Sequence
N701 TAAGGCGA	S501 TAGATCGC
N702 CGTACTAG	S502 CTCTCTAT
N703 AGGCAGAA	S503 TATCCTCT
N704 TCCTGAGC	S504 AGAGTAGA
N705 GGACTCCT	S505 GTAAGGAG
N706 TAGGCATG	S506 ACTGCATA
N707 CTCTCTAC	S507 AAGGAGTA
N708 CAGAGAGG	S508 CTAAGCCT
N709 GCTACGCT	
N710 CGAGGCTG	
N711 AAGAGGCA	
N712 GTAGAGGA	

توالی‌یابی MiSeq Illumina

این توالی یابی در مرکز آنالیز پیشرفته ژنومیکس دانشگاه گولف، کشور کانادا صورت گرفت.

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

داده‌های خام توالی‌یابی شده به روش NGS توسط cloud-based software, 2016 Illumina, MSR; Metagenomics,version; 2.4.60.8 مورد آنالیز قرار گرفت. آنالیز متاژنومیکس بر روی داده‌های 16S rRNA از ناحیه آمپلیکون V3 و V4، ارگانیسم‌ها را به کمک پایگاه داده Greengenes رده‌بندی کرد. نتایج طبقه‌بندی ریزسازواره‌ها در سطوح سلسله، رده، راسته، خانواده، جنس و گونه به‌صورت جداول و به شکل گرافیکی ارائه گردید. میانگین و نوار خطا از درصد فراوانی نسبی گونه‌های باکتریایی از دوغ گوسفندی توسط نرم‌افزار Microsoft Excel 2010 حاصل گردید.

نتایج و بحث

شناسایی فنوتیپی جامعه لاکتیکی دوغ گوسفندی عشایر سومار

بر اساس شناسایی اولیه (مشاهده میکروسکوپی و تست کاتالاز) 40 جدایه میکروبی مشکوک به جدایه لاکتیکی شناسایی شدند. که در مرحله بعد توسط تست‌های بیوشیمیایی و فیزیولوژی به‌صورت Lactobacillus و Pediococcus در سطح جنس طبقه‌بندی شدند (جدول 2).

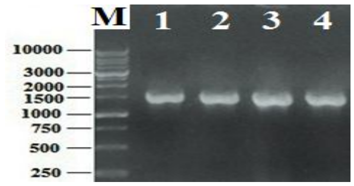
نمونه‌ای ازتشکیل محصول PCR حاصل از تکثیر ژن 16S rRNA برخی جدایه‌های لاکتیکی دوغ گوسفندی در شکل 1 نشان داده می‌شود.

نتایج شناسایی مولکولی حاصل از توالی‌یابی در ناحیه 16S rRNA gene در جدول 3، نشان داده می‌شوند.

جدول 2- خصوصیات فنوتیپی باکتری‌های اسید لاکتیک جدا شده از شیر گوسفندی در سطح جنس

جنس	Pediococcus	Lactobacillus	*Non-lactic acid bacteria genus*
فراوانی نسبی	% 3/5	%88	% 8/5
مورفولوژی	کوکسی	باسیلی	
تولید CO2 از گلوکز	-	±	
رشد در			
10°C	±	±	
45°C	±	±	
6.5% NaCl	±	±	
pH 4.4	+	±	
pH 9.6	−	−	

+ نشانه رشد؛ - نشانه عدم رشد؛ ± بین گونه‌ها متفاوت است نتایج شناسایی مولکولی وابسته به کشت جامعه میکروبی دوغ گوسفندی عشایر سومار



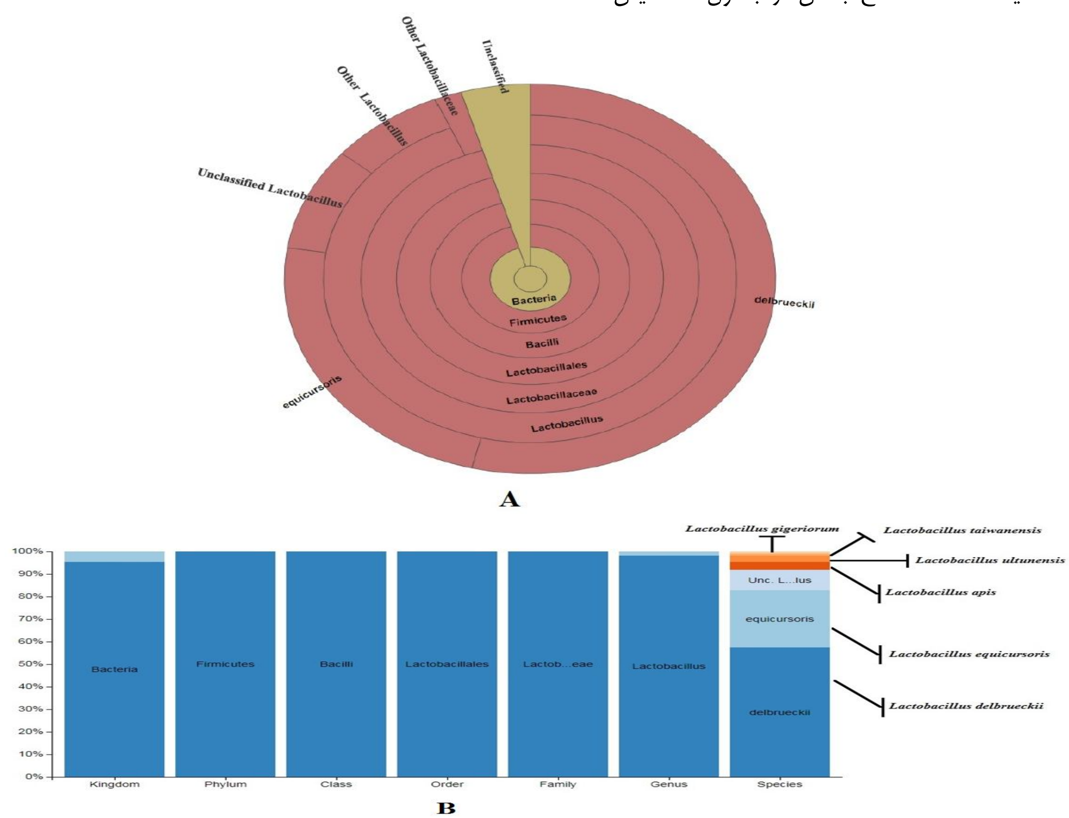
شکل 1- ژن تکثیر شده 16S rRNA از برخی جدایه‌های مورد مطالعه. ردیف‌های 1، 2، 3 و 4 محصول PCR و M مارکر 1000bp

جدول 3- نتایج شناسایی جدایه‌های دوغ گوسفندی.

کد جدایه	نزدیک ترین خویشاوند شناسایی شده	درصد شباهت در شناسایی
40-39-38-37-36-35-34-32-21-13-12-11-9-5-2-1	*Lactobacillus delbrueckii*	100
33-18-31-27-17-15-6-4	*Lactobacillus apis*	99
30-24-19-16	*Lactobacillus ultunensis*	100
26-25-10-3	*Pediococcus argentinicus*	99
29-28-23-22-20-14-8-7	جدایه‌های شناسایی نشده	

شناسایی مولکولی مستقل از کشت جامعه میکروبی دوغ گوسفندی عشایر سومار

درکل 217/395، 274/690 و 217/008 خوانش خام از توالی‌یابی illumine توسط Miseq platform در سه تکرار حاصل گردید. نتایج یک تکرار آنالیز مولکولی مستقل از کشت فلور میکروبی نمونه دوغ توسط تکنیک NGS تا سطح جنس در جدول 4 نمایش داده می‌شود. همچنین، سهم جنس لاکتوباسیلوس و تنوع گونه‌های آن به‌عنوان جنس غالب در دوغ گوسفندی در بین سایر گونه‌های باکتریایی از سلسله تا گونه به شکل چارت خورشیدی (A) و چارت نواری (B) که توسط آنالیز NGS به‌دست آمده است در شکل 2 در یک نگاه کلی به‌خوبی قابل مشاهده است.



شکل2- چارت خورشیدی از فراوانی نسبی جامعه میکروبی غالب دوغ گوسفندی (A) و چارت میله‌ای 20 باکتری شاخص دوغ گوسفندی (B)

جدول 4- نتایج طبقه‌بندی باکتری‌های دوغ گوسفندی در سطوح تاکسونومیک تا سطح جنس توسط تکنیک NGS

Sequencing Statistics

Total R ads	Reads Passing Quality Filtering	% Reads Passing Quality Filtering
217,395	183,531	84.4 %

Classification Rate Summary

Taxonomic Level	Reads Classified to Taxonomic Level	% Total Reads
Kingdo	183,384	99.92 %
Phylum	182,924	99.67 %
Class	182,646	99.52 %
Order	182,192	99.27 %
Family	181,555	98.92 %
Genus	177,988	96.98 %
Species	159,433	86.87 %

Top Kingdom Classification Results

Classification	Number of Reads	% Total Reads
Bacteria	183,381	99.92 %
Unclassified at Kingdom level	147	0.08 %
Viruses	3	0.00 %

Top Phylum Classification Results

Classification	Number of Reads	% Total Reads
Firmicutes	181,401	98.84 %
Proteobacteria	1,103	0.60 %
Unclassified at Phylum level	607	0.33 %
Actinobacteria	142	0.08 %
Bacteroidetes	131	0.07 %
Tenericutes	62	0.03 %
Verrucomicrobia	21	0.01 %
Thermodesulfobacteria	13	0.01 %

Top Class Classification Results

Classification	Number of Reads	% Total Reads
Bacilli	180,798	98.51 %
Unclassified at Class level	885	0.48 %
Gammaproteobacteria	773	0.42 %
Clostridia	366	0.20 %
Actinobacteria	141	0.08 %
Betaproteobacteria	131	0.07 %
Alphaproteobacteria	111	0.06 %
Sphingobacteriia	85	0.05 %

Top Order Classification Results

Classification	Number of Reads	% Total Reads
Lactobacillales	179,597	97.86 %
Unclassified at Order level	1,339	0.73 %
Bacillales	855	0.47 %
Enterobacteriales	402	0.22 %
Clostridiales	284	0.15 %
Actinomycetales	103	0.06 %
Pseudomonadales	91	0.05 %
Chromatiales	89	0.05 %

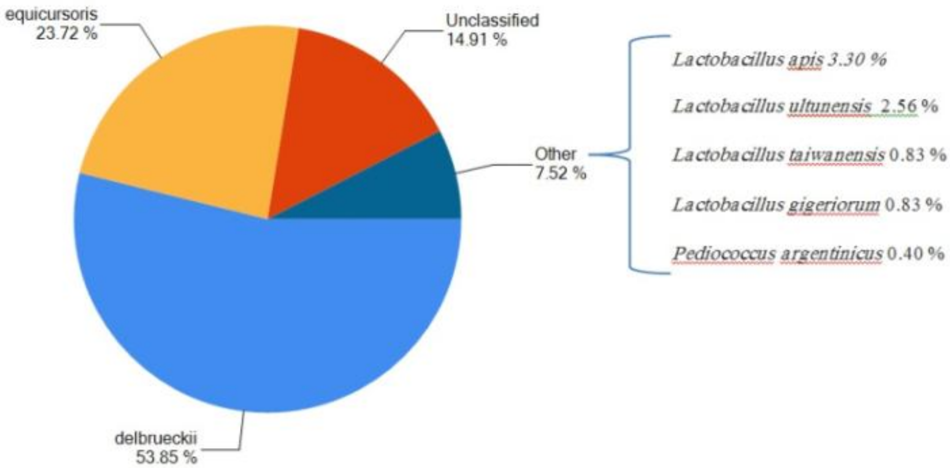
Top Family Classification Results

Classification	Number of Reads	% Total Reads
Lactobacillaceae	177,860	96.91 %
Unclassified at Family level	1,976	1.08 %
Streptococcaceae	616	0.34 %
Enterococcaceae	410	0.22 %
Bacillaceae	409	0.22 %
Enterobacteriaceae	402	0.22 %
Paenibacillaceae	153	0.08 %
Clostridiaceae	127	0.07 %

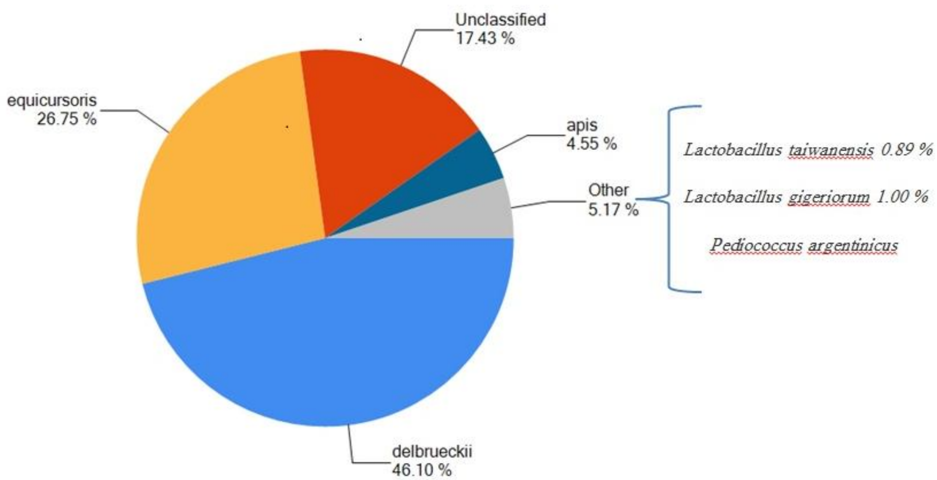
Top Genus Classification Results

Classification	Number of Reads	% Total Reads
Lactobacillus	172,659	94.08 %
Unclassified at Genus level	5,543	3.02 %
Pediococcus	1,962	1.07 %
Streptococcus	611	0.33 %
Enterococcus	360	0.20 %
Candidatus Blochmannia	207	0.11 %
Alkalibacillus	199	0.11 %
Cohnella	108	0.06 %

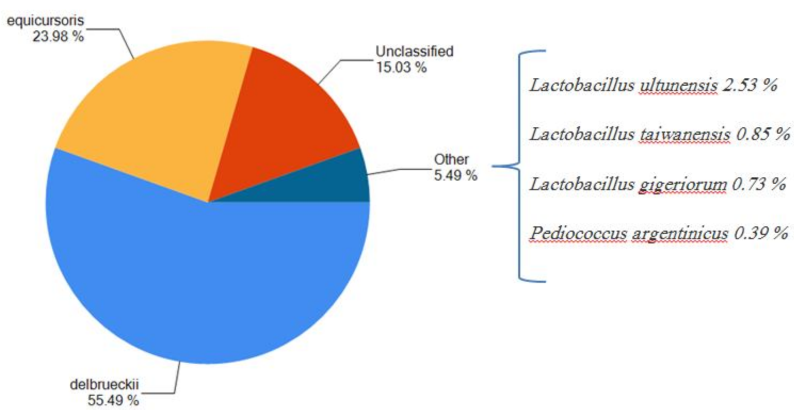
چون نتایج این مطالعه در 3 تکرار گزارش شده است در شکل 3 سهم هر گونه در هر تکرار و در شکل 4 نیز درصد میانگین فراوانی نسبی گونه‌های غالب باکتری از این 3 تکرار به همراه نوار خطای آنها برای نمونه نشان داده می‌شود.



نتایج برای تکرار 1

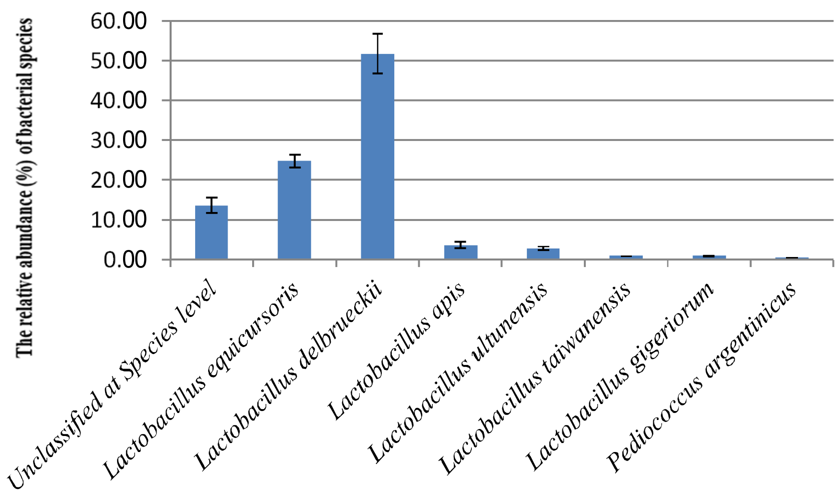


نتایج برای تکرار 2

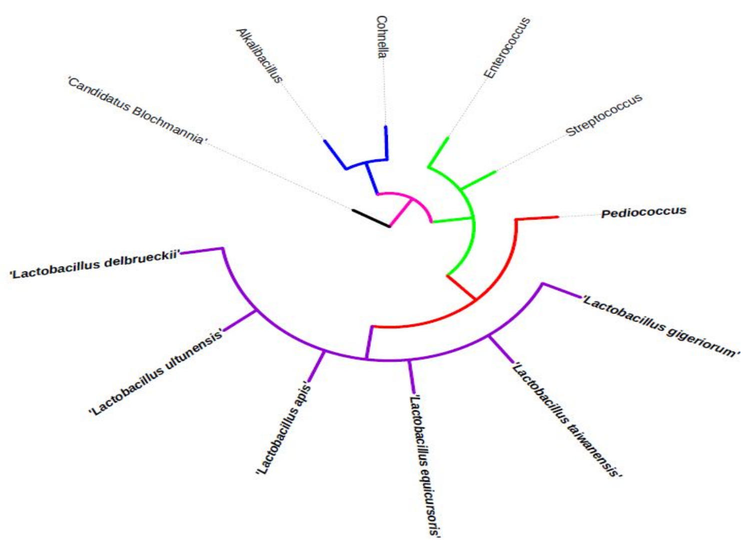


نتایج برای تکرار 3

شکل 3- نتایج طبقه‌بندی در سطح گونه جامعه میکروبی دوغ گوسفندی در 3 تکرار



شکل4- فراوانی نسبی گونه‌های باکتری (٪) در 3 تکرار از دوغ گوسفندی



شکل 5- درخت تکامل ژنتیکی براساس نسل جدید توالی‌یابی آمپلیکون ژن 16S rRNA از جامعه باکتریایی دوغ گوسفندی

درخت تکامل ژنتیکی برای گونه‌های شناسایی شده با بیشترین فراوانی از دوغ گوسفندی که براساس داده‌های حاصل از نسل جدید توالی یابی و با بهره گیری از دو سایت https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/CommonTree/wwwcmt.cg و http://itol.embl.de/upload.cgi حاصل گردید، در شکل 5 نشان داده می‌شود.

با توجه به مقایسه نتایج فنوتیپی و مولکولی در سطح جنس برخی موارد تناقض و عدم تطابق دیده می‌شود و نتایج توزیع تنوع ژنتیکی به‌روش مولکولی با روش فنوتیپی اختلاف دارد. البته نتایج شناسایی فنوتیپی به دلایل مختلفی از دقت پایین‌تری نسبت به شناسایی مولکولی برخوردار است. Moraes و همکاران در سال 2013 مطالعه‌ای جهت مقایسه دقت دو روش فنوتیپی شامل سیستم API50CHL (شامل تخمیر 49 کربوهیدرات در کنار هیدرولیز اسکولین) و روش بیولوژی (شامل یک پلیت منحصر به فرد برای گرم مثبت‌ها و گرم منفی‌ها جهت تخمیر 96 کربوهیدرات) با دو روش مولکولی توالی‌یابی 16S rDNA و Species specific PCR reactions برای تعدادی باکتری اسید لاکتیک مشخص انجام دادند. در این مطالعه قابلیت اعتماد به دو روش مولکولی مورد استفاده 100% بود و تست‌های فنوتیپی قابلیت اعتماد پایین‌تری نشان داده بطوری‌که برای دو روش بیولوژی و روش API50CHL به‌ترتیب 99/9 - 74 و 99/9-78/2% گزارش شد. به‌طورکلی روش‌های فنوتیپی دارای محدودیت‌ها و

معایبی در شناسایی باکتری‌های اسید لاکتیک هستند که از آن جمله می‌توان به موارد زیر اشاره کرد:

تکرارپذیری ضعیف، تغییر شکل از حالت کروی به میله‌ای کوتاه در طی رشد و بالعکس (Moraes *et al.*, 2013)، قدرت پایین تمایز (Mohania *et al.*, 2008)، تاثیرپذیری واکنش آنزیمی در تخمیر کربوهیدرات‌ها وابسته به زمان و دمای گرمخانه‌گذاری (Ouadghiri *et al.*, 2005) و عدم بیان برخی ژن‌ها (بعضی آنزیم‌های تخمیر کننده کربوهیدرات‌ها) در برخی باکتری‌ها که مرتبط با شرایط محیطی می‌باشد (Moraes *et al.*, 2013).

همچنین اکثر باکتری‌های اسید لاکتیک نیازهای تغذیه‌ای مشابهی برای رشد خود داشته و نتایج شناسایی براساس روش‌های بیوشیمیایی در بسیاری موارد قطعی نبوده و می‌توانند نتایج یکسانی حاصل کنند (Moraes *et al.*, 2013).

همچنین تفاوت‌هایی در نتایج شناسایی مولکولی مستقل از کشت و وابسته به کشت مشاهده گردید. براساس نتایج شناسایی وابسته به کشت براساس توالی‌یابی ناحیه 16S rRNA به‌ترتیب گونه‌های *Lactobacillus delbrueckii*، *Lactobacillus apis*، *Lactobacillus ultunensi* ،*Pediococcus argentinicus* بیشترین فراوانی را نشان دادند. براساس جدول 3 و شکل 4 هر دو روش نتایج مشابهی در شناسایی گونه‌های *Lactobacillus delbrueckii*، *Lactobacillus apis* و *Pediococcus argentinicus* نشان دادند. اما روش وابسته به کشت قادر به شناسایی گونه‌های *Lactobacillus equicursoris*، *Lactobacillus ultunensis*، *Lactobacillus taiwanensis* و *Lactobacillus gigeriorum* نبود. احتمالا این گونه‌های باکتریایی قادر به بازیافت از نمونه توسط کشت و تشکیل کلنی جهت استخراج DNA برای شناسایی مولکولی وابسته به کشت نبوده است.

به دلایل متعددی که در زیر اشاره می‌شود روش مولکولی مستقل از کشت نسبت به وابسته به کشت بیشتر مورد تایید بوده و نتایج آن معرف بهتری از جامعه میکروبی نمونه می‌باشد. شناسایی باکتری‌ها به روش مولکولی وابسته به کشت که شامل کشت باکتری، سپس استخراج DNA از کلنی باکتری، انجام PCR و توالی‌یابی بر روی ژن‌های خاصی که معمولا در ناحیه 16S rRNA قرار دارد دارای معایبی است. از جمله اینکه به دلیل تنش‌های محیطی و حتی اختصاصی بودن برخی محیط‌های کشت، برخی باکتری‌ها ضعیف شده، یا از بین رفته و قادر به رشد بر روی محیط کشت، تشکیل کلنی و قابل شناسایی نمی‌باشند و مطالعات مشخص کرده است که اکثریت عظیمی از تنوع زیستی میکروبی بوسیله روش‌های بر پایه کشت از دست می‌روند و اطلاعات حاصل از شناسایی آن‌ها کامل نمی‌باشد. همچنین بسیاری از ریزسازواره‌ها را نمی‌توان در شرایط آزمایشگاه کشت داد که این موضوع در درک فیزیولوژی، ژنتیک و اکولوژی جامعه میکروبی محدودیت ایجاد می‌نماید. بنابراین روش‌های شناسایی مولکولی مستقل از کشت بسیار در این زمینه مفید می‌باشند. استفاده از دانش و ابزاری جامع به نام متاژنومیکس راه حل مناسب رفع این مشکل است. متاژنومیکس اجازه مطالعه اکولوژی میکروبی در سطح بسیار بالاتر و جزئی تر از قبل را می‌دهد. یکی از روش‌ها در هدف‌گیری ژن در متاژنومیکس PCR-DGGE است. با استفاده از روش DGGE، تشخیص بیماری‌های میکروبی و شناسایی ریز سازواره ها در مقیاس بزرگ می‌تواند ساده‌تر و سریع‌تر به‌دست آید (طباطبایی و پورمظاهری، 1391). امروزه در جدیدترین روش مطالعه متاژنومیکس بر پایه تکنیک‌های نسل جدید توالی‌یابی نیز می‌توان به‌منظور بررسی بهتر فیلوژنتیکی و تنوع متابولیکی ریزسازواره‌ها بهره برد. که هدف ما در این مطالعه نیز استفاده از تکنیک متاژنومیکس بر پایه نسل جدید توالی‌یابی جهت شناسایی دقیق و کامل جامعه میکروبی دوغ عشایر ایران بود. براساس این نتایج مولکولی، به دلیل عدم رعایت بهداشت توسط عشایر، در فلور غالب میکروبی دوغ گوسفندی علاوه بر جنس لاکتوباسیلوس (با بیشترین درصد فراوانی) و استرپتوکوکوس سایر جنس‌های لاکتیکی شامل Pediococcus و Enterococcus و همچنین جنس *Candidatus Blochmannia* از خانواده انتروباکتریاسه، جنس Alkalibacillus از خانواده باسیلاسه و جنس Cohnella از خانواده Paenibacillaceae شناسایی گردید. باوجود اینکه جنس‌های Enterococcus، *Candidatus Blochmannia*، Alkalibacillus و Cohnella به‌عنوان جنس‌های غالب در دوغ شناسایی گردیدند اما گونه‌های آن سهم چشمگیری در فلور غالب میکروبی نشان ندادند که می‌تواند به دلیل غالب شدن فلور لاکتوباسیلوسی و پدیوکوکوسی در ماست و دوغ و تولید باکتریوسین‌هایی توسط این دو جنس باشد که به‌دلیل طبیعت عملکردی باکتریوسین این ماده ضدمیکروبی می‌تواند برعلیه گونه‌هایی با خویشاوندی نزدیک به باکتری‌های تولیدکننده خود عمل کند نظیر انتروکوکوس‌ها. بنابراین علت عدم رشد انتروکوکوس‌ها به‌صورت فلور غالب می‌تواند به دلیل حضور باکتریوسین‌های حاصل از جنس لاکتوباسیلوس و پدیوکوکوس باشد. براساس مطالعات گذشته گونه‌هایی از جنس Alkalibacillus از محیط‌های طبیعی قلیایی نظیر خاکهای جنگلی غیرنمکی و حوضچه‌های معدنی جداسازی گردیدند (Usami *et al.*, 2007; Romano *et al.*, 2005).

گونه‌هایی از جنس Cohnella نیز از محیط‌های طبیعی نظیر تالاب‌های آتشفشانی، غدد ریشه گیاهان و … جدا شده‌اند (Cho *et al.*, 2007; García-Fraile *et al.*, 2008).

همچنین جنس *Candidatus Blochmannia* از مورچه چوب که زیستگاه اصلی آن جنگل و مناطق صحرایی حاوی چوب درختان می‌باشد جداسازی شده است (Feldhaar *et al.*, 2007).

بنابراین به دلیل ماهیت زندگی عشایر در طبیعت، حضور این

جنس‌ها در محصولات تولیدی توسط آن‌ها بعید نمی‌باشد. در بین گونه‌های شناسایی شده در جنس لاکتوباسیلوس گونه *Lactobacillus delbrueckii* بیشترین فراوانی را نشان داد که به دلیل نقش کلیدی زیرگونه بولگاریکوس این گونه در تولید ماست از شیر است و چون دوغ از ماست، آب و نمک تولید می‌شود طبیعتا در دوغ حضور آن با فراوانی بالا قابل انتظار است.

اما *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus* باکتری کلیدی دیگر در تولید ماست محسوب می شود و به دنبال لاکتوباسیلوس باید در دوغ حاصل از ماست حضور چشمگیری داشته باشد، اما جزء گونه‌های با فراوانی بالا در نمونه گزارش نگردید و سهم جنس استرپتوکوکوس در نمونه دوغ بسیار پایین بود. از آنجاییکه از سالیانه گذشته مطالعات علمی حضور دو باکتری *Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus* و *Streptococcus salivarius subsp thermophiles* را در تولید ماست از شیر تایید کرده است که باید فلور غالب را در ماست و دوغ حاصل از آن تشکیل دهد اما همانطور که در بالا اشاره گردید در این مطالعه تنها حضور *Lactobacillus delbrueckii* به‌عنوان یکی از فلورهای غالب میکروبی و جامعه لاکتیکی ماست تایید شد و سهم جنس استرپتوکوکوس تنها 0/33% بود. البته در برخی مطالعات انجام شده در دنیا بر روی محصولات تولیدی از ماست نظیر دوغ نیز مشابه این مطالعه حضور گونه *Lactobacillus delbrueckii* بدون حضور *Streptococcus salivarius* تایید شده است. Azadnia و Khan Nazer (2009) در تحقیقی که در شناسایی باکتری‌های اسید لاکتیک دوغ انجام دادند موفق به جداسازی گونه‌های زیر گردیدند. *Lactococcus lactis subsp. cremoris*; *Leuconostoc mesenteroides subsp. cremoris*, *Lactobacillus helveticus* ; *Lactobacillus plantarum* ; *Lactobacillus brevis*; *Lactobacillus casei subsp. casei*; *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*.

در مطالعه‌ای که Asmahan (2011) بر روی جداسازی و شناسایی باکتری‌های اسید لاکتیک دوغ از منطقه خارطوم سودان انجام داد موفق به شناسایی گونه‌های *لاکتوکوکوس لاکتیس، لوکونوستوک مزنتروئیدس، لاکتوباسیلوس هلویتیکوس، لاکتوباسیلوس پلانتاروم، لاکتوباسیلوس برویس، لاکتوباسیلوس کازئی، لاکتوباسیلوس دلبروکی* گردید. در مطالعه ما بعد از *Lactobacillus delbrueckii*، گونه‌های *Lactobacillus equicursoris*، *Lactobacillus apis*، *Lactobacillus ultunensis*، *Lactobacillus taiwanensis*، *Lactobacillus gigeriorum* و همچنین گونه *Pediococcus argentinicus* از جنس پدیوکوکوس به‌ترتیب بیشترین فراوانی را نشان دادند. در پژوهش حاضر، گونه نادری از پدیوکوکوس به نام *Pediococcus argentinicus* که اولین بار در سال 2008 از گندم تخمیر شده آرژانتینی گزارش شد نیز شناسایی گردید (De Bruyne *et al*., 2008). همچنین *Lactobacillus taiwanensis* و *Lactobacillus gigeriorum* در دوغ یا احتمالا ماست اولیه نیز فرصت رشد پیدا کرده به‌طوریکه جزء فلور غالب شناسایی شدند که می‌تواند به دلیل حضور این گونه‌ها در مایه ماست اضافه شده به شیر و قابلیت رشد این گونه‌ها در شرایط محیطی ایجاد شده حاصل از تخمیر و عدم رعایت شرایط بهداشتی تولید ماست و در نهایت دوغ حاصل از آن دانست. علاوه بر *Pediococcus argentinicus* تمام گونه‌های شناسایی شده غیر از *Lactobacillus delbrueckii* نیز جزء گونه‌های تازه کشف شده لاکتیکی محسوب می‌شوند نظیر *Lactobacillus taiwanensis* که اولین بار به‌عنوان گونه جدید توسط Wang در سال 2009 از یونجه جدا گردید. که دلیل حضور این گونه در دوغ گوسفندی عشایر نیز می‌تواند به دلیل عدم رعایت بهداشت عشایر در نگهداری مایه ماست، فراوری ماست و دوغ حاصل از آن باشد. گونه نوظهور دیگر که به تازگی توسط Gulat-Okalla و همکاران (2012) از جوجه جدا گردید *Lactobacillus gigeriorum* است که از دوغ عشایر نیز جدا گردید و می‌تواند ناشی از انتقال آلودگی از محل نگهداری طیور به ماست یا شیر باشد. *L. apis* نیز به‌عنوان یک گونه نوظهور اولین بار توسط Killer و همکارانش (2014) از معده زنبور عسل جدا گردید و بنابراین حضور این گونه در دوغ عشایر می‌تواند به دلیل همجواری زیستنگاه زنبور عسل و محل زندگی عشایر که معمولا صحرا و دامنه کوه است بعید نباشد (Killer *et al*., 2014).

در ارتباط با گونه *L. ultunensis* شناسایی شده در دوغ عشایر براساس مطالعات انجام شده در دنیا جداسازی آن از موکوس معده گزارش شده است (Goldstein *et al*., 2015; Roos *et al*., 2005).

Lactobacillus equicursoris به‌عنوان یک گونه جدید ابتدا توسط Morita و همکارانش (2010) از مدفوع اسب جدا گردید. که حضور آن در دوغ عشایر می‌تواند همانطور که قبلا اشاره گردید به دلیل بهداشت ضعیف این عشایر در نگهداری مایه ماست و انتقال آلودگی از اسب‌های حاضر در محل زندگی آن‌ها باشد.

براساس مطالعات انجام شده، در بین گونه‌های شناسایی شده تنها *Lactobacillus delbrueckii* دارای فعالیت پربیوتیکی می‌باشد و سایر گونه‌های موجود جزء باکتری‌های تازه شناسایی شده بوده و تاکنون تحقیقی مبنی بر فعالیت پروبیوتیکی آن‌ها انجام نشده است و پیشنهاد می‌شود مطالعاتی در این زمینه در آینده بر روی این گونه‌ها انجام شود. وجود ترکیب هتروژنی از فلور میکروبی لاکتیکی نامتداول در این محصول با حضور گونه‌های باکتریایی در آن که در مطالعات انجام شده در دنیا از محیط، اسب، زنبور و طیور جدا شده‌اند می‌تواند نشانه‌ای از کیفیت بهداشتی پایین این محصول باشد و حضور دو

خـــانواده عامـــل ایجـــاد عفونـــت و مســـمومیت شـــامل 0/22% Enterobacteriaceae و 0/07% Clostridiaceae در دوغ تایید شد که احتمال حضور گونه‌های بیماری‌زا از این دو خـانواده در دوغ بعیـد نمی‌باشد اما بـه دلیـل غالـب بـودن فلـور لاکتیکـی و کـاهش pH محصول، این دو خانواده قدرت رشد نداشته و سهم بسیار ناچیزی در کل جامعه میکروبی دارا بودند که قابل صرف نظر است. به‌طور کلـی در این مطالعه آشکار شد کـه از نظـر بهداشـتی کیفیـت دوغ عشـایر سومار پایین بوده اما فلور میکروبی غالب آن خطر جدی برای سلامت انسان نخواهد داشت.

منابع

طباطبایی، م. و پورمظاهری، ه.، 1391، متاژنومیکس و کاربرد آن در شناسایی تنوع ژنتیکی اکوسیستم های میکروبی. فصلنامه ژنتیک نوین، 7 (4)، 313-324.

Alegría, Á., Álvarez-Martín, P., Sacristán, N., Fernández, E., Delgado, S. & Mayo, B., 2009. Diversity and evolution of the microbial populations during manufacture and ripening of Casín, a traditional Spanish, starter-free cheese made from cow's milk. *International journal of food microbiology*, *136*(1), 44-51.

Armougom, F. & Raoult, D., 2009. Exploring microbial diversity using 16S rRNA high-throughput methods. Journal of Computer Science and Systems Biology, *2*(1), 74-92.

Ashmaig, A., Hasan, A. & Gaali El, E., 2009. Identification of lactic acid bacteria isolated from traditional Sudanese fermented camel's milk (Gariss). *African Journal of Microbiology Research*, 3(8), 451-457.

Asmahan Azhari, A., 2011. Isolation and Identification of Lactic Acid Bacteria Isolated from Traditional Drinking Yoghurt in Khartoum State, Sudan. *Current Research in Bacteriology*, 4, 16-22.

Azadnia, P. & Khan Nazer, A. H., 2009. Identification of lactic acid bacteria isolated from traditional drinking yoghurt in tribes of Fars province. *Iranian Journal of Veterinary Research*, 10 (3), 235-240.

Benson Harold, J., 1967. Microbiological applications; a laboratory manual in general microbiology.

Bokulich, N. A. & Mills, D. A., 2012. Next-generation approaches to the microbial ecology of food fermentations. *BMB reports*, *45*(7), 377-389

Cardinal. M. J., Meghrous, J., Lacroix, C. and Simard, R. E., 1997. Isolation of Lactococcus Lactis Strains Producing Inhibitory Activity against Listeria. *Food Biotechnology*. 11(2), 129-46.

Cho, E.A., Lee, J.S., Lee, K.C., Jung, H.C., Pan, J.G. & Pyun, Y.R., 2007. Cohnella laeviribosi sp. nov., isolated from a volcanic pond. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, *57*(12), 2902-2907.

De Bruyne, K., Franz, C., Vancanneyt, M., Schillinger, U., Mozzi, F., de Valdez, G. F., De Vuyst, L & Vandamme, P., 2008. *Pediococcus argentinicus* sp. nov. from Argentinean fermented wheat flour and identification of Pediococcus species by pheS, rpoA and atpA sequence analysis. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 58, 2909-2916.

Feldhaar, H., Straka, J., Berthold, K., Krischke, M., Mueller, M.J., Gross, R. & Stoll, S., 2007. Nutritional upgrading for omnivorous carpenter ants by the endosymbiont Blochmannia. *BMC biology*, *5*(1), 48.

García-Fraile, P., Velazquez, E., Mateos, P.F., Martínez-Molina, E. & Rivas, R., 2008. Cohnella phaseoli sp. nov., isolated from root nodules of Phaseolus coccineus in Spain, and emended description of the genus Cohnella. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, *58*(8), 1855-1859.

Goldstein, E. J., Tyrrell, K. L. & Citron, D. M., 2015. *Lactobacillus* Species: Taxonomic Complexity and Controversial Susceptibilities. *Clinical Infectious Diseases*, 60 (2), S98-S107.

Gulat-Okalla, M. L., Motreff, L., Gouyette, C., Bouchier, C., Clermont, D. & Bizet, C., 2012. *Lactobacillus gigeriorum* sp. nov., isolated from chicken crop Sylvie Cousin. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 62, 330–334.

Harrigan, W., 1998. Laboratory methods in food microbiology: Gulf Professional Publishing.

Khedid, K., Faid, M., Mokhtari, A., Soulaymani, A. & Zinedine, A., 2009. Characterization of lactic acid bacteria isolated from the one humped camel milk produced in Morocco. *Microbiological research*, 164(1), 81-91.

Killer, J., Dubna, S., Sedlacek ,I. & Švec, P., 2014. Lactobacillus apis sp. nov., from the stomach of honeybees (Apis mellifera), having an in vitro inhibitory effect on the causative agents of American and European foulbrood. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 64, 152–157.

Mardis, E. R., 2008. The impact of next-generation sequencing technology on genetics. *Trends in genetics*, *24*(3), 133-141.

Mohania, D., Nagpal, R., Kumar, M., Bhardwaj, A., Yadav, M., Jain, S., Marotta, F., Singh, V., Parkash, O. & Yadav, H., 2008. Molecular approaches for identification and characterization of lactic acid bacteria. *Journal of digestive Diseases*, *9*(4), 190-198.

Moraes, P. M., Perin, L. M., Silva, J. A. & Nero, L. A., 2013. Comparison of phenotypic and molecular tests to identify lactic acid bacteria. *Brazilian Journal of Microbiology*, 44(1), 109-12.

Morita, H., Shimazu, M., Shiono, H. & Hattori, M., 2010. Lactobacillus equicursoris sp. nov., isolated from the faeces of a thoroughbred racehorse. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 60(1), 109-12.

Nossa, C. W., Oberdorf, W. E., Yang, L., Aas, J. A., Paster, B. J., DeSantis, T. Z. & Pei, Z., 2010. Design of 16S rRNA gene primers for 454 pyrosequencing of the human foregut microbiome. *World journal of gastroenterology: WJG*, *16*(33), 4135.

Ouadghiri, M., Amar, M., Vancanneyt, M. & Swings, J., 2005. Biodiversity of lactic acid bacteria in Moroccan soft white cheese (Jben). *FEMS microbiology letters*, *251*(2), 267-271.

Romano, I., Lama, L., Nicolaus, B., Gambacorta, A. & Giordano, A., 2005. Alkalibacillus filiformis sp. nov., isolated from a mineral pool in Campania, Italy. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, *55*(6), 2395-2399.

Roos, S., Engstrand, L. & Jonsson, H., 2005. Lactobacillus gastricus sp. nov., Lactobacillus antri sp. nov., Lactobacillus kalixensis sp. nov. and Lactobacillus ultunensis sp. nov., isolated from human stomach mucosa. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, *55*(1), 77-82.

Ruiz-Barba, J.L., Maldonado, A. & Jiménez-Díaz, R., 2005. Small-scale total DNA extraction from bacteria and yeast for PCR applications. *Analytical biochemistry*, *347*(2), 333-335.

Salminen, S. & Von Wright, A. eds., 2004. Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects. CRC Press. Marcel Dekker, 139, 73-103.

Usami, R., Echigo, A., Fukushima, T., Mizuki, T., Yoshida, Y. & Kamekura, M., 2007. Alkalibacillus silvisoli sp. nov., an alkaliphilic moderate halophile isolated from non-saline forest soil in Japan. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, *57*(4), 770-774.

Wang, L.T., Kuo, H.P., Wu, Y.C., Tai, C.J. & Lee, F.L., 2009. Lactobacillus taiwanensis sp. nov., isolated from silage. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, *59*(8), 2064-2068.

Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 14, No. 5, Dec- Jan 2019, p. 685-698

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد 14، شماره 5، آذر - دی 1397، ص. 698-685

Comparison of microbial diversity of ewe's drinking yogurt from somar region nomads using Next-Generation Sequencing and culture dependent molecular methods

N. Davati[1*], S. Hesami[2]

Received: 2017.12.11
Accepted: 2018.04.09

Introduction: Nowadays, More people are interested in consuming organic products. Many of the organic foods and dairy products are produced by rural people and nomads in Iran. Some people are concerned about using of the contaminated organic foods with pathogenic microorganisms, because some of these organic foods are produced under poor hygienic conditions. On the other hand, many native strains of probiotic bacteria especially lactic acid bacteria can be found in these organic foods. In this study, the microbial community and sanitary quality of ewe's drinking yogurt produced by Somar region nomads, by using culture dependent molecular method and next-generation sequencing **(**NGS), as a new tool for the culture independent **molecular** characterization of bacteria, were assessed.

Materials and methods: A total of three Ewe's drinking yogurt samples were collected from the nomads of Somar region in Iran under sterile conditions. For phenotypic identification of lactic acid bacteria, a volume of 0.1 milliliters of appropriate dilutions was cultured on MRS agar and M17 agar media. The plates were incubated at 37^{o}C under anaerobic condition with Anaerocult® A for 48 hours. Typical LAB characteristics colonies were purified by streaking method on MRS agar and M17 agar. The catalase negative and Gram positive isolates were selected as presumptive lactic acid bacteria for phenotypic identification to the genus level. These isolated bacteria were tested for growth at 10^{0}C and 45^{0}C in MRS and M17 broth, gas production from glucose, growth in the presence of 6.5% and 18% of NaCl, growth at pH 4.4 and pH 9.6 and arginine hydrolysis. Isolates were identified by amplification of the 16S ribosomal RNA gene by Polymerase Chain Reaction and ribosomal DNA sequencing as a culture dependent molecular method. After DNA extraction of isolates, PCR was performed using prokaryotic 16S rDNA universal primers 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') and 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3). In the next step, the culture-independent molecular method based on next-generation sequencing of 16S ribosomal RNA gene amplicons was applied. The V3 and V4 regions of 16S ribosomal RNA gene were amplified using Forward Primer 5'TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNGGCWGCAG and Reverse Primer 5'GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACHVGGGTATCTAATCC Overhang adapter sequences were appended to the primer pair sequences for compatibility with Illumina index and sequencing adapters. The Illumina overhang adapter sequences to be added to locus-specific sequences were: Forward overhang: 5' TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG- [locus- specific sequence] Reverse overhang: 5' GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAG-[locus- specific sequence]. Both contained an Illumina adapter region for sequencing on the Illumina MiSeq System. Then, Illumina sequencing on MiSeq was performed. The fastq files from the next generation sequencing were analyzed with BaseSpace (cloud-based software, MSR: Metagenomics, version: 2.4.60.8). This metagenomics analysis classified organisms from V3 and V4 amplicon using a database of 16S rRNA data and performed a taxonomic classification using the Greengenes database showing species level classification in a graphical format (http://greengenes.lbl.gov/). The analysis output was a classification of reads at several taxonomic levels: kingdom, phylum, class, order, family, genus, and species. The analysis results included tables, cluster pie charts, phylogenetic trees and bar charts. The average and error bars of the relative abundance (%) of bacterial species from ewe's milk and yogurt were calculated using Microsoft Excel 2010 software.

Results & Discussion: A total of 40 bacteria as lactic acid bacteria were isolated from ewe's drinking yogurt.

1. Assistant professor, Department of Food Science and Technology, Bu-Ali Sina University. Hamedan, Iran.
2. Assistant professor, Department of Biology, Faculty of Science, Bu-Ali Sina University. Hamedan, Iran.
(*-Corresponding Author Email: n.davati@basu.ac.ir)

Among isolated bacteria, two different genus of lactic acid bacteria were phenotypically characterized as 88% Lactobacillus, 3.5% Pediococcus and 8.5% Non-lactic acid bacteria. Isolates were identified by ribosomal DNA sequencing as *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus apis*, *Lactobacillus ultunensis* and *Pediococcus argentinicus*.

The microbial community from ewe's drinking yogurt were identified on the basis of Next-generation sequencing (NGS) at genus level as 94.08% Lactobacillus, 1.07% Pediococcus, 0.33% Streptococcus, 0.20% Enterococcus, 0.11% Candidatus Blochmannia, 0.11% Alkalibacillus, 0.06% Cohnella and 3.02% unclassified. At species level 24.82% *Lactobacillus equicursoris*, 51.81% *Lactobacillus delbrueckii*, 3.61% *Lactobacillus apis*, 2.79% *Lactobacillus ultunensis*, 0.86% *Lactobacillus taiwanensis*, 0.85% *Lactobacillus gigeriorum*, 0.42% *Pediococcus argentinicus* and 13.64% unclassified were identified. Findings of this study have provided fundamental knowledge on sanitary quality and microbial composition of drinking yogurt produced by Somar nomads. Both phenotypic and molecular identification methods showed Pediococcus and Lactobacillus genus as the dominant genera in these samples. Molecular identification results showed *Lactobacillus delbrueckii* as the dominant species. Four species, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus apis*, *Lactobacillus ultunensis* and *Pediococcus argentinicus* were identified by both cultivation-dependent and cultivation-independent (NGS) methods. Rather, culture-dependent and culture-independent methods were found to be complementary in describing the microbial community of the ewe's drinking yogurt produced by Somar nomads. The next-generation sequencing was found to be more accurate method in detecting the microbial diversity of drinking yogurt. The results showed poor hygienic quality of ewe's drinking yogurt from Somar nomads, but there were no pathogenic bacteria in this product.

Keywords: Next-Generation Sequencing, Drinking Yogurt, Ewe, nomds.